

19) PATENT BUREAU OF JAPAN (JP)

12) OFFICIAL GAZETTE FOR GRANTED PATENTS (A)

Japanese Patent Application Publication Kokai: Hei 2-5880

43) Publication Date: January 10, 1990

Number of Claims: 17

Request for Examination: Not requested (Total of 9 pages)

51) International Class. ³	JP Class.	Intrabureau Code No.
C 12 N	15/57	
	1/21	
	9/52	7823-4B
//(C 12 N	9/52	
C 12 R	1:19)	
	8717-4B	C 12 N 15/00 A

54) DNA encoding post-prolylpeptidase

21) Application No.: Sho 63-158490

22) Application Date: June 27, 1988

71) Applicant: Sun Star(?) Corp., Ltd.

3-1 Asahi-cho, Takatsuki-shi, Osaka-fu

72) Inventor: Shoji Nakamura

5-41-307 Makida-cho, Takatsuki-shi, Osaka-fu

Akira Takeuchi

1-18-2-503 Matsugaoka, Takatsuki-shi, Osaka-fu

74) Agent: Mamoru Aoyama, Patent Attorney, and other 1 person

1. Title of Invention

DNA encoding post-prolylpeptidase.

2. Patent Claims

- (1) A recombinant DNA replicatable in *E. coli*, obtained by inserting a gene that exists in the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis* and encodes a protease specific for the hydrolysis of proline-containing peptides on the carboxyl side of the proline (called post-prolylpeptidase in the following), in a vector for *E. coli*.
- (2) The recombinant DNA described under Claim (1) of the Patent Claims is pSN3.
- (3) The recombinant DNA described under Claim (1) of the Patent Claims is pSN11.
- (4) A method for producing the recombinant DNA, characterized by (a) fragmentation of the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis*, (b) preparation of a recombinant DNA by inserting the resultant DNA fragment in a vector for *E. coli*, (c) transfection of the recombinant DNA in *E. coli*, (d) selection of a post-prolylpeptidase-producing *E. coli* strain from the transfected *E. coli*, and (e) recovery of the above recombinant DNA from the selected *E. coli* strain.
- (5) The method described under Claim (4) of the Patent Claims, in which the transfection in steps (b) and (c) is performed by construction of the recombinant DNA by ligation of the resultant DNA fragment with a cosmid vector for *E. coli* and subsequent introduction into a λ phage, followed by infection of *E. coli* with the resultant λ phage.
- (6) The method described under Claim (5) of the Patent Claims, in which the cosmid vector is pHC79.
- (7) The method described under any one of Claims (4)-(6) of the Patent Claims, in which the resultant recombinant DNA is sub-cloned.
- (8) The method described under Claim (7) of the Patent Claims, in which the resultant recombinant DNA is sub-cloned three times, where, first, the starting recombinant DNA is cut with BamHI and an about 17 kb DNA fragment is self-ligated, second, the DNA resultant from the first sub-cloning is partially cut with Sau3AI and an about 4 kb DNA fragment is collected and inserted in a vector for *E. coli*, and, third, the

DNA resultant from the second sub-cloning is cut with EcoRI and an about 2.9 kb DNA fragment is collected and inserted in a vector for *E. coli*.

- (9) An *E. coli* strain containing the recombinant DNA that is obtained by inserting the gene encoding the Bacteroides gingivalis-derived post-prolylpeptidase in a vector for *E. coli* and is replicatable in *E. coli*.
- (10) The *E. coli* strain described under Claim (9) of the Patent Claims, that is *E. coli* HB101/pSN3 or HB101/pSN11 (Bikoken deposition No. 10045 or 10046).
- (11) A method for producing post-prolylpeptidase, characterized by culture of the *E. coli* strain containing the recombinant DNA, that is obtained by inserting the gene encoding the Bacteroides gingivalis-derived post-prolylpeptidase in a vector for *E. coli* and is replicatable in *E. coli*, and recovery of post-prolylpeptidase from the culture.
- (12) A method for producing post-prolylpeptidase, characterized by (a) fragmentation of the chromosomal DNA of Bacteroides gingivalis, (b) preparation of a recombinant DNA by inserting the resultant DNA fragment in a vector for *E. coli*, (c) transfection of the recombinant DNA in *E. coli*, (d) selection of a post-prolylpeptidase-producing *E. coli* strain from the transfected *E. coli*, and (e) culture of the selected *E. coli* strain and recovery of post-prolylpeptidase from the culture.
- (13) The method described under Claim (12) of the Patent Claims, in which the transfection in steps (b) and (c) of (5) is performed by construction of the recombinant DNA by ligation of the resultant DNA fragment with a cosmid vector for *E. coli* and subsequent introduction into a λ phage, followed by infection of *E. coli* with the resultant λ phage.
- (14) The method described under Claim (13) of the Patent Claims, in which the cosmid vector is pHC79.
- (15) The method described under any of Claims (12)-(14) of the Patent Claims, in which after step (d) the resultant recombinant DNA is further sub-cloned.

(16) The method described under Claim (15) of the Patent Claims, in which the recombinant DNA-containing *E. coli* strain is *E. coli* HB101/pSN3 or HB101/pSN11 (Bikoken deposition No. 10045 or 10046).

(17) A DNA fragment, containing the approximately 2.9 kb gene encoding post-prolylpeptidase, that exists in and is obtained by digestion with EcoRV of an about 3.5 kb Sau3AI digestion fragment of the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis*.

3. Detailed Description of the Invention

[Field in Industry]

The present invention is related to a recombinant DNA containing the gene encoding the *Bacteroides gingivalis*-derived post-prolylpeptidase. It is also related to a method for producing the DNA, an *E. coli* strain containing the same, a method for producing the post-prolylpeptidase using the *E. coli*, and a DNA fragment encoding the post-prolylpeptidase.

[Prior Art and Problems]

In recent years, it has been considered that oral bacterial infection is involved in the development of adult parodontosis. In particular, the Gram-negative anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis* has been highly frequently detected from the disease foci of the patients and hence has attracted significant attention as a major pathogenic bacterium for parodontosis (J. S. Lote et al., J. Dent. Res. 63:412, 1984). This finding has provided an important clue to the development of effective therapies for parodontosis. However, currently there is still no effective therapy, and it is desired that an accurate and fast diagnostic method can be developed for early treatment of parodontosis. Several methods for diagnosing parodontosis have been attempted. For example, bacteria are isolated and cultured from specimens from parodontal pockets to identify the pathogenic bacterium. However, this method is difficult to use on a routine basis since anaerobic bacteria are difficult to culture in terms of equipment and since the method is both labor-intensive and time-intensive. In addition, it is possible to use a method detecting an enzyme activity that is considered to accompany the pathogenic bacterium. For example, *Bacteroides gingivalis* secretes extracellularly a protease for the hydrolysis of the peptide bond of proline on the carboxyl side (that is, post-prolylpeptidase). It is possible to utilize the detection of this enzyme activity in diagnosis. Diagnostic methods using an enzyme reaction are excellent in terms of time, labor, ease of performance and cost, but are not satisfactory in terms of detection sensitivity.

Recently, the development of diagnostic methods using a monoclonal antibody or DNA probe for parodontosis, that can overcome the deficiencies of the above diagnostic methods, has been proposed.

In general, for producing a monoclonal antibody, a large amount of the antigen is required. Culture of an anaerobic bacterium in a large quantity for the purpose of preparation of an antigen is very difficult and time-consuming. Hence, the problem is that the target antigen cannot be obtained with a high efficiency. On the other hand, regarding the development of diagnostic methods using a DNA probe, it is necessary to isolate a DNA fragment for hybridization with the chromosomal DNA of the target pathogenic bacterium.

Against this background, the present invention is to provide a method to highly efficiently produce post-prolylpeptidase from the Gram-negative anaerobic bacterium, *Bacteroides gingivalis*. Moreover, the aim of the present invention is to provide a recombinant DNA and an *E. coli* strain used in the production method, and to provide a method for producing the recombinant DNA. Furthermore, the present invention is to provide a DNA fragment for hybridization with the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis*.

[Means of Solving the Problems]

Thus, as the first mode of the present invention, a recombinant DNA replicatable in *E. coli* is provided, obtained by inserting a gene, that exists in the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis* and encodes a protease specific for the hydrolysis of proline-containing peptides on the carboxyl side of the proline (that is, post-prolylpeptidase), in a vector for *E. coli*.

Moreover, a method is provided for producing the recombinant DNA, consisting of fragmentation of the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis*, preparation of a recombinant DNA by inserting the resultant DNA fragment in a vector for *E. coli*, transfection of the recombinant DNA in *E. coli*, selection of a post-prolylpeptidase-producing *E. coli* strain from the transfected *E. coli*, and recovery of the above recombinant DNA from the selected *E. coli* strain.

Furthermore, a DNA fragment is provided, containing the approximately 2.9 kb gene encoding post-prolylpeptidase, that exists in and is obtained by digestion with EcoRV of an about 3.5 kb Sau3AI digestion fragment of the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis*.

The recombinant DNA of the present invention is obtained by inserting the gene encoding the post-prolylpeptidase derived from the Gram-negative anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis* in a vector for *E. coli*, and is replicable in *E. coli*. The inserted gene encoding post-prolylpeptidase can be derived from any strain identified as *Bacteroides gingivalis* in systematic bacteriology. Preferable strains include *Bacteroides gingivalis* strain ATCC33277 and *Bacteroides gingivalis* strain 381 (derived from Forsize [? Forsythe, phonetic] Dental Center, USA).

The vector for *E. coli* is one replicatable in *E. coli*, with an appropriate marker. There are many such vectors for *E. coli*, available commercially. In the present invention, any such known vector can be used. Appropriate examples include pBR328, pHC79, etc.

The recombinant DNA of the present invention can be produced by the following five steps.

Step 1

In step 1, the raw material chromosomal DNA is extracted from the cells and fragmented. Thus, the raw material chromosomal DNA is extracted from the cells of *Bacteroides gingivalis* and contains the gene encoding the post-prolylpeptidase.

The extraction of chromosomal DNA from cells can be performed by standard phenol method [K. Miura, *Biochim. Biophys. Acta* 72, pp619-629 (1963)].

The fragmentation of extracted DNA can be performed with a restriction enzyme or a nucleotide-sequence-nonspecific endonuclease. Besides, the chromosomal DNA can also be fragmented by mechanical treatment.

Step 2

In step 2, the chromosomal DNA fragment obtained in step 1 is inserted in a DNA vector for *E. coli* to prepare a recombinant DNA. If a restriction enzyme producing an adhesive end is used in step 1, the above DNA insertion vector is cut with the same restriction enzyme. After annealing with the chromosomal DNA fragment obtained in step 1, these DNAs are connected with a DNA ligase such as T4 DNA ligase to prepare the recombinant DNA. In this case, to increase the efficiency of the recombination, after the DNA insertion vector is cut with the

restriction enzyme, it is preferable to perform alkali phosphatase treatment by the standard Ullrich method.

If a restriction enzyme producing a blunt end, a nucleotide-sequence-nonspecific endonuclease, or mechanical treatment is used in step 1 for the fragmentation of chromosomal DNA, the end is connected with a linker, cut with an appropriate restriction enzyme, followed by connection with the vector DNA fragment.

Step 3

In step 3, the recombinant DNA obtained in step 2 is transfected into *E. coli*. In general, transfection can be performed by the competent cell method.

If the chromosomal DNA fragment obtained in step 1 is a DNA fragment with a size of about 30-40 kb, the recombinant DNA can be incorporated into the head of the λ phage by a λ phage in-vitro packaging method. By infecting *E. coli* with this phage, the recombinant DNA can be introduced into the *E. coli* cells. In this case, the vector for *E. coli* can be a so-called cosmid vector, containing, in the vector DNA, the cos portion derived from λ phage DNA, for example, pHC79.

Step 4

In step 4, among transfected cells, a strain is selected that has been transfected with the recombinant DNA having a DNA fragment containing the gene existing in the starting chromosomal DNA and encoding post-prolylpeptidase, and produces an appropriate amount of the *Bacteroides gingivalis*-derived post-prolylpeptidase.

First, by the marker used on the DNA-introducing vector used, cells containing the recombinant DNA are selected primarily. When pBR322 or pHC79 is used as the vector, the cells are cultured in a medium containing tetracycline or ampicillin, thereby obtaining tetracycline- or ampicillin-resistant cells.

Then, the antibiotic-resistant cells thus obtained are seeded in a medium containing the same antibiotic, as master plate. For the recombinant *E. coli* strain grown on the master plate, each of its colonies is isolated. Each clone is suspended in a buffer containing lysozyme, and

further lysed by the freeze-thaw method. For lysing the cells, other methods such as mechanical treatments including sonication can also be used.

By assaying post-prolylpeptidase activity in the *E. coli* lysate thus obtained, cells having the recombinant DNA containing the gene existing in the starting chromosomal DNA and encoding post-prolylpeptidase can be selected secondarily. For assaying post-prolylpeptidase activity, the known method using a synthetic substrate can be used. In this case, the substrate can be any one with a chromogenic group on the carboxyl side of proline, such as β -naphthylamine or p-nitroaniline as amide. Such examples include glycyl-proline-4-methoxy- β -naphthylamide hydrochloride, Na-benzoyl-arginyl-glycyl-phenylalanine-proline-4-methoxy- β -naphthylamide, etc. The substrate concentration in the reaction mixture is normally 0.05-2 mM, preferably about 0.2 mM.

Step 5

In step 5, the recombinant DNA is recovered from the cells selected in step 4. The recovery can be performed easily by the aforementioned phenyl method or density gradient centrifugation method.

Sub-cloning

By sub-cloning the recombinant DNA obtained in step 5, the needed DNA portions that are not needed are removed. Consequently, the recombinant DNA can be retained stably in cells and enzyme production capability can be further increased. The sub-cloning is performed by cutting the resultant recombinant DNA with an appropriate restriction enzyme, inserting in a vector for *E. coli* as described above, transfecting into cells, selecting cells and recovering the recombinant DNA. The restriction enzyme for cutting the recombinant DNA as starting material for the sub-cloning can be any one without a digestion site in the gene of the enzyme. The sub-cloning can be performed multiple times, and in each sub-cloning a portion of the DNA is removed.

By transfecting the recombinant DNA obtained in step 5 or in the subsequent sub-cloning in *E. coli*, cells producing the *Bacteroides gingivalis*-derived post-prolylpeptidase can be obtained. The DNA fragment of *Bacteroides gingivalis* existing in the recombinant DNA obtained by the sub-cloning has restriction enzyme sites as shown in the representative restriction enzyme map of Fig. 1. Thus, since the DNA fragment of *Bacteroides gingivalis* existing in the

recombinant DNA obtained by the sub-cloning has a size of about 3.5 kb, it contains the sequence from the BamHI site to the Sau3AI site. In addition, regarding restriction enzyme sites, there is a HincII site about 30 bp away from the BamHI site, two EcoRV sites about 150 bp and 3050 bp away, a PvuII site about 900 bp away, an AatI site about 1650 bp away, a PvuI site about 1800 bp away, a BglI site about 2160 bp away, a HindIII site about 2850 bp away, and a KpnI site near the HindIII site.

By culturing the cells and recovering the enzyme from the cells, post-prolylpeptidase can be produced. The culture of *E. coli* cells can be performed by the standard method. For example, the culture can be performed with shaking in a medium containing an appropriate carbon source, nitrogen source and trace amounts of metal elements. The carbon source can be glucose or glycerol. The concentration of the carbon source is normally 0.1-10 wt%, preferably about 2 wt%. The nitrogen source can be organic nitrogen sources, such as peptone, polypeptone, meat extract, etc. and inorganic nitrogen sources, such as ammonium sulfate, ammonium chloride, etc. The concentration of the nitrogen source is normally 0.5-5 wt%, preferably about 2 wt%. To prevent loss of the recombinant DNA, the antibiotic corresponding to the drug resistance marker of the plasmid vector used can be added to the medium. If the vector used is pHc79, ampicillin preferably at about 50 µg/mL or tetracycline preferably at about 10 µg/mL can be added. If the vector used is pBR328, in addition to the above antibiotics, chloramphenicol can also be added, preferably at about 10 µg/mL.

By culturing *E. coli* cells transfected with the recombinant DNA in the above medium, the *Bacteroides gingivalis*-derived post-prolylpeptidase can be accumulated intracellularly. The resultant culture liquid is subjected to low speed centrifugation (5000 rpm, 20 min) to collect the cells. After suspension in a buffer, the cells are homogenized or lysed, and from the intracellular extract the post-prolylpeptidase can be obtained. For the homogenization or lysis of cells, standard method can be used, for example, sonication, lysis with lysozyme, freeze and thaw, etc.

[Practical Examples]

In the following, practical examples of the present invention are described. The restriction enzymes used in the practical examples were all obtained commercially from Toyo Boseki Corp., Ltd.

Practical Example 1

Preparation of the recombinant DNA pSN1 and E. coli strain containing the same

Bacteroides gingivalis strain 381 was cultured in 1 L of the anaerobic BH1 medium (2 wt% of peptone, 1 wt% of yeast extract, 0.0005 wt% of hemin, 0.05 wt% of cysteine, trace amounts of vitamin K and inorganic salts, in pure water, pH 7.0) at 37°C under anaerobic conditions, then collected. After washing once with physiological saline (0.85 wt%), chromosomal DNA was prepared from the cells by the phenol method, followed by purification by the cesium chloride equilibrium density gradient centrifugation method, thereby obtaining 500 µg of chromosomal DNA. The DNA, 500 µg, was treated with *Sau3AI* at 37°C for 15 min, then the liquid was subjected to 10-40% sucrose density gradient centrifugation (24,000 rpm, 40 hr). A fraction containing a DNA fragment of about 40 kb was recovered. After 10 µg of the cosmid vector pHC79 had been treated with *Bam*HI at 37°C for 3 hr, alkali phosphatase treatment was performed by the standard method. Ten µg of the vector DNA fragment was mixed with about 40 kb of the above chromosomal DNA, and treated with T4 ligase at 10°C for 16 hr, thereby obtaining a recombinant DNA.

One µg of the resultant recombinant DNA was subjected to λ phage in-vitro packaging, that is, introduction of recombinant DNA into the head of λ phage, by the standard method. For the λ phage in-vitro packaging, a commercially available packaging kit (Amersham International plc.) was used and the experiment was performed as instructed by the manufacturer.

The λ phage with the recombinant DNA incorporated in the head was used to infect the *E. coli* strain HB101 to introduce the recombinant DNA into the *E. coli* cells.

To perform the primary selection of cells containing the recombinant DNA, culture was performed in medium L containing about 50 µg/mL of ampicillin (1.5 wt% of agar, 1 wt% of peptone, 0.5 wt% of yeast extract, 1 wt% of table salt, and pure water) at 30°C for 36 hr. Each of colonies of the grown recombinant DNA-containing cells was seeded in the same medium to prepare a master plate. Part of the colony of recombinant DNA-containing cells on the master plate was isolated, and suspended in 0.1 M Tris-hydrochloric acid buffer (0.1 mL, pH 7.0) containing 100 µg/mL of lysozyme. Cell lysis was performed by the freeze-thaw using the standard method.

Eighty μL of the resultant cell lysate was mixed with 20 μL of 1 mM glycyl-proline-4-methoxy- β -naphthylamide hydrochloride in a 96-well microtiter plate. After reaction at 37°C for 4 hr, 70 μL of a stopping and color developing solution (0.5 wt% of fast garnet [phonetic] GBC reagent, 20 wt% of Tween 20, 0.1 M acetic acid-sodium hydroxide, pH 7.0) was added. A strain showing a significant enzyme activity was selected (strain showing a red color in the reaction solution). This strain was named as *E. coli* HB101/pSN1 and deposited with the Industrial Technology Research Center, Microbiological Industrial Technology Research Institute (Bikoken) on May 28, 1988 (Bikoken deposition No. 10043). The bacteriological characteristics of this strain were identical to those of *E. coli* HB101 except for the very high post-prolylpeptidase activity.

The DNA was extracted from the *E. coli* strain HB101/pSN1 by the phenol method. Using density gradient centrifugation, the recombinant DNA was accumulated in a large amount. This recombinant DNA was named as pSN1. The size of pSN1 was about 43 kb.

Practical Example 2

Preparation of the recombinant DNA pSN2 and *E. coli* strain containing the same

Ten μg of pSN1 was treated with BamHI at 37°C for 3 hr, then the BamHI-treated sample was subjected to agarose gel electrophoresis to separate the DNA fragments. Among the detected DNA fragments, the largest 17 kb DNA was recovered from the gel by the standard method and subjected to self-ligation using T4 ligase.

The resultant recombinant DNA was used to transfect *E. coli* strain HB101 by the competent cell method. For *E. coli* cells containing the recombinant DNA that were grown in medium L containing ampicillin at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, post-prolylpeptidase activity was examined by the method described under Practical Example 1. Significant post-prolylpeptidase activity was detected in all examined colonies. The *E. coli* containing this 17 kb recombinant DNA was named as *E. coli* strain HB101/pSN2 and deposited with the Bikoken on May 28, 1988 (Bikoken deposition No. 10044).

The bacteriological characteristics of this strain were identical to those of *E. coli* HB101 except for the very high post-prolylpeptidase activity.

The DNA was extracted from the *E. coli* strain HB101/pSN2 by the phenol method. By density gradient centrifugation, the recombinant DNA was accumulated in a large amount. This recombinant DNA was named as pSN2.

Practical Example 3

Preparation of the recombinant DNA pSN3 and *E. coli* strain containing the same

Fifty μ g of pSN2 was treated with *Sau*3AI at 37°C for 80 min, then the treated sample was subjected to 10-40% sucrose density gradient centrifugation (24,000 rpm, 40 hr). A fraction containing about 3-5 kb DNA fragments was recovered. Besides, 10 μ g of pBR328 was treated with *Bam*HI at 37°C for 3 hr, then, after alkali phosphatase treatment by the standard method, and was mixed with the above *Sau*3AI-treated DNA fragment. A recombinant DNA was obtained using T4 ligase. The resultant recombinant DNA thus obtained was used to transfect the *E. coli* strain HB101 by the competent cell method. The transfected cells were grown in a medium containing ampicillin at a concentration of 50 μ g/mL and chloramphenicol at a concentration of 10 μ g/mL. For the grown transfected cells, post-prolylpeptidase activity was examined by the method described under Practical Example 1, and a strain with significant post-prolylpeptidase activity was selected. This strain was named *E. coli* strain HB101/pSN3 and deposited with the Bikoken on May 28, 1988 (Bikoken deposition No. 10045). The bacteriological characteristics of this strain were identical to those of *E. coli* HB101, except for the very high post-prolylpeptidase activity.

From *E. coli* strain HB101/pSN2, the DNA was extracted by phenol method. By density gradient centrifugation, the recombinant DNA was accumulated in a large amount. This recombinant DNA was named as pSN3. Fig. 1 shows the restriction enzyme map of the recombinant DNA pSN4. In the figure, the chromosomal fragment of *Bacteroides gingivalis* strain 381 is shown in white, while the vector pBR328 is shown in black. The size of pSN3 was 8.4 kb. The *Bacteroides gingivalis* strain 381-derived 3.5 kb DNA fragment was inserted at the *Bam*HI site of pBR328.

Practical Example 4

Preparation of the recombinant DNA pSN11 and *E. coli* strain containing the same

Ten μ g of pSN3 was treated with *Eco*RV at 37°C for 3 hr, then by agarose gel electrophoresis DNA fragments were separated. Among two detected DNA fragments, the smaller 2.9 kb fragment was recovered from gel by standard method. The DNA fragment thus

obtained was connected with EcoRV- and alkali phosphatase-treated pBR328 using T4 ligase, thereby obtaining a recombinant DNA. The recombinant DNA was used to transfect *E. coli* strain HB101 by the competent cell method. The transfected cells were grown in the same medium as described above. For the grown transfected cells, the post-prolylpeptidase activity was examined by the method described under Practical Example 1, and a strain with significant post-prolylpeptidase activity was selected. This strain was named as *E. coli* strain HB101/pSN11 and deposited with the Bikoken on May 28, 1988 (Bikoken deposition No. 10046).

The bacteriological characteristics of this strain were identical to those of *E. coli* HB101 except for the very high post-prolylpeptidase activity.

From *E. coli* strain HB101/pSN11, DNA was extracted by the phenol method. The recombinant DNA was recovered by density gradient centrifugation.

Fig. 2 schematically shows these procedures using a restriction enzyme map. In the figure, the chromosomal fragment of *Bacteroides gingivalis* strain 381 is shown in white while the vector pBR328 is shown in black. The size of pSN11 was 7.8 kb. The *Bacteroides gingivalis* strain 381-derived 2.9 kb DNA fragment was inserted at the EcoRV site of pBR328.

Practical Example 5

Production of post-prolylpeptidase

The post-prolylpeptidase producing capability of *E. coli* strain HB101/pSN3 and HB101/pSN11 thus obtained was examined.

Each strain was seeded in 1 L of broth L (1 wt% of peptone, 0.5 wt% of yeast extract, 1 wt% of table salt, and pure water) and cultured at 37°C with shaking. The cells were collected, and suspended in 0.01 M Tris-hydrochloric acid buffer (pH 7.5). Sonication was performed (100 W, 2 min), then the cellular debris was removed by centrifugation (12,000 rpm, 20 min). The post-prolylpeptidase activity was examined in the resultant supernatant.

As control, *E. coli* strain HB101/pBR328 was cultured under the same conditions, and the post-prolylpeptidase activity was examined in the supernatant obtained, using the same procedures as above.

Glycyl-proline-4-methoxy- β -naphthylamide hydrochloride was used as the substrate for the enzyme reaction.

Regarding reaction conditions, to 320 μ L of the cell lysate as enzyme extract, 80 μ L of 1 mM substrate was added. After reaction at 37°C for 2 hr, 160 μ L of a stopping and color developing solution (0.5 wt% of fast garnet [phonetic] GBC reagent, 20 wt% of Tween 20, 0.1 M acetic acid-sodium hydroxide, pH 7.0) was added. The amount of 4-methoxy- β -naphthylamine released by the enzyme reaction was measured by photospectrometry (O. D.).

The results are shown in Table 1. In the table, 1 unit was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ M 4-methoxy- β -naphthylamine at 37°C in 1 hr.

Table 1

Strain	Post-prolylpeptidase activity (U/mg)
E. coli HB101/pBR328	0.65
E. coli HB101/pSN3	20.69
E. coli HB101/pSN11	33.88

[Effects of the Invention]

By the present invention, post-prolylpeptidase, which is released from *Bacteroides gingivalis*, can be produced highly efficiently. Moreover, an approximately 2.9 kb DNA fragment encoding post-prolylpeptidase, that exists in the approximately 3.5 kb *Sau3AI* digestion fragment from the chromosomal DNA of *Bacteroides gingivalis* and can be cut off with *EcoRV* can also be obtained.

4. Brief Legends to the Figures

Fig. 1 shows the restriction enzyme map of pSN3. Fig. 2 shows the restriction enzyme map of pSN11 illustrating the preparation of pSN11.

Applicant: Sun Star [phonetic] Corp., Ltd.

Agent: Mamoru Aoyama, Patent Attorney, and 1 other person



■ pBR328



EcoRV fragment
(2900 bp)

■ pBR328

⑫ 公開特許公報(A) 平2-5880

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)1月10日

C 12 N 15/57

1/21

9/52

// (C 12 N 9/52

C 12 R 1:19)

7823-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 17 (全9頁)

⑭ 発明の名称 ポストプロリルペプチダーゼをコードするDNA

⑮ 特 願 昭63-158490

⑯ 出 願 昭63(1988)6月27日

⑰ 発 明 者 中 村 昇 二 大阪府高槻市牧田町5-41-307

⑱ 発 明 者 竹 内 明 大阪府高槻市松ヶ丘1丁目18番2-503

⑲ 出 願 人 サンスター株式会社 大阪府高槻市朝日町3番1号

⑳ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ポストプロリルペプチダーゼをコードするDN

A

2. 特許請求の範囲

(1) バクテロイデス・ジンジバリス

(*Bacteroides gingivalis*)の染色体DNA中に存在する、プロリンを含有するペプチドのプロリンのカルボキシル側のペプチド結合を特異的に加水分解するプロテアーゼ(以下、ポストプロリルペプチダーゼと称する)をコードする遺伝子を大腸菌用ベクターに組み込んだ大腸菌内で複製可能な組換え体DNA。

(2) pSN3である特許請求の範囲第(1)項記載の組換え体DNA。

(3) pSN11である特許請求の範囲第(1)項記載の組換え体DNA。

(4) (a) バクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNAを断片化し、(b) 得られたDNA断片を大腸菌用ベクターに組み込んで組換え体DNAを

作製し、(c) 該組換え体DNAで大腸菌を形質転換し、(d) 形質転換された大腸菌よりポストプロリルペプチダーゼを産生する菌株を選択し、(e) 選択された大腸菌から前記組換え体DNAを回収することを特徴とする組換え体DNAの製造方法。

(5) (b) 及び(c) 工程における形質転換を、得られたDNA断片を大腸菌用コスミドベクターに連結し、ラムグファージ粒子内に導入して組換え体DNAを作製し、こうして得られたラムグファージを大腸菌に感染させることにより行なう特許請求の範囲第(4)項記載の方法。

(6) コスミドベクターがpHC79である特許請求の範囲第(5)項記載の方法。

(7) さらに、得られた組換え体DNAをサブクローニングする特許請求の範囲第(4)項ないし第(6)項のいずれか1項に記載の方法。

(8) サブクローニングを3回行ない、1回目のサブクローニングはBamHIを用いて原料組換え体DNAを切断し、約17KbのDNA断片を自己連結することによって行ない、2回目のサブク

ローニングは1回目のサブクローニングによって得られたDNAをSau3A1を用いて部分切断し、約4KbのDNA断片を集めて大腸菌用ベクターに組み込むことによって行ない、3回目のサブクローニングは2回目のサブクローニングによって得られたDNAをEcoRVを用いて切断し、約2.9KbのDNA断片を集めて大腸菌用ベクターに組み込むことによって行なう特許請求の範囲第(7)項記載の方法。

(9)バクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼをコードする遺伝子が大腸菌用ベクターに組み込んだ大腸菌内で複製可能な組換え体DNAを含有する大腸菌。

(10)イー・コリ(E. coli)HB101/pSN3又はHB101/pSN11(微生物研寄第10045号又は第10046号)である特許請求の範囲第(9)項記載の大腸菌。

(11)バクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼをコードする遺伝子が大腸菌用ベクターに組み込んだ大腸菌内で複製可能

(14)コスミドベクターがpHC79である特許請求の範囲第(13)項記載の方法。

(15)(d)工程の後に、さらに、得られた組換え体DNAをサブクローニングする特許請求の範囲第(12)項ないし第(14)項記載の方法。

(16)組換え体DNAを含有する大腸菌がイー・コリHB101/pSN3又はHB101/pSN11(微生物研寄第10045号又は第10046号)である特許請求の範囲第(15)項記載の方法。

(17)バクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNA中の約3.5KbのSau3A1切断断片中に存在し、EcoRVによって切り出される約2.9Kbのポストプロリルペプチダーゼをコードする構造遺伝子を含むDNA断片。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はバクテロイデス・ジンジバリスが産生するポストプロリルペプチダーゼをコードする遺伝子を組み込んだ組換え体DNAに関する。また、該DNAの製造方法、それを含む大腸菌、この大

な組換え体DNAを含有した大腸菌を培養し、その培養物から該ポストプロリルペプチダーゼを回収することを特徴とするポストプロリルペプチダーゼの製造方法。

(12)(a)バクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNAを断片化し、(b)得られたDNA断片を大腸菌用ベクターに組み込んで組換え体DNAを作製し、(c)該組換え体DNAで大腸菌を形質転換し、(d)形質転換された大腸菌よりポストプロリルペプチダーゼを産生する菌株を選択し、(e)選択された大腸菌を培養してその培養物からバクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼを回収することを特徴とするポストプロリルペプチダーゼの製造法。

(13)(b)及び(c)工程における形質転換を、得られたDNA断片を大腸菌用コスミドベクターに連結し、ラムダファージ粒子内に導入して組換え体DNAを作製し、こうして得られたラムダファージを大腸菌に感染させることにより行なう特許請求の範囲第(12)項記載の方法。

腸菌を用いたポストプロリルペプチダーゼの製造方法及びポストプロリルペプチダーゼをコードするDNA断片にも関する。

[従来の技術と課題]

近年、成人性歯周疾患の発症には種々の口腔内細菌の感染が関与していると考えられるようになってきている。とりわけ、グラム陰性嫌気性桿菌であるバクテロイデス・ジンジバリスは患者の病巣から高い頻度で検出される為、歯周疾患の主たる原因菌であるとして注目されており[ジェイ・スロツツら、ジャーナル・デンタル・リサーチ(J. S. Slots et al., J. Dent. Res. 63:412, 1984)、このような知見が歯周疾患の有効な治療法開発に大きな手がかりを与えている。しかしながら、有効な治療法がない現状においては、歯周疾患の早期治療のための正確、且つ迅速な診断方法の開発が望まれる。歯周病変を診断する方法がいくつか試みられている。例えば、歯周ポケットのサンプルから細菌を分離培養し、原因菌を同定することが挙げられる。しかし、嫌気性細菌を培

養する際の設備面での困難さや、時間と労力を要するといった点から広く一般に普及されうる方法とは言いがたい。又、原因菌に伴なうと考えられる酵素活性の検出を用いることも可能である。例えば、バクテロイデス・ジンジバリスは菌体外に、プロリンのカルボキシル側のペプチド結合を加水分解するプロテアーゼ、すなわち、ポストプロリルペプチダーゼを分泌しており、この酵素活性の検出を診断方法に応用することが可能である。酵素反応を利用した診断方法は時間、労力、簡便さ、コスト面ではすぐれた方法ではあるが、検出感度の点では、未だ、満足すべき診断方法ではない。

以上のような診断方法の欠点を補うべく、最近ではモノクローナル抗体やDNAプローブを用いた歯周疾患診断方法の開発が提案されている。

一般にモノクローナル抗体を作成する場合、大量の精製された抗原を必要とするが、抗原を調製する為に嫌気性細菌を大量に培養することは非常に困難で時間を要する。その為、高効率で目的の抗原を得ることができないという問題がある。又、

菌用ベクターに組み込んだ、大腸菌にて複製できる組換え体DNAを提供するものである。

又、本発明は、バクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNAを断片化し、得られたDNA断片を大腸菌用ベクターに組み込んで組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAで大腸菌を形質転換し、形質転換された大腸菌より、ポストプロリルペプチダーゼを産生する菌株を選択し、選択された大腸菌から前記組換え体DNAを回収することからなる組換え体DNAの製造方法を提供するものである。

さらに、本発明はバクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNA中の約3.5 KbのSau3A I切断断片中に存在し、EcoRVによって切り出される約2.9 Kbのポストプロリルペプチダーゼをコードする構造遺伝子を含むDNA断片を提供するものである。

本発明の組換え体DNAは、大腸菌用ベクターにグラム陰性嫌気性桿菌であるバクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼ

DNAプローブを用いた診断方法の開発については、目的とする原因菌の染色体DNAとハイブリダイズ(交叉)するDNA断片を単離する必要がある。

このような事情に鑑み、本発明は、グラム陰性嫌気性細菌であるバクテロイデス・ジンジバリスの産生するポストプロリルペプチダーゼを高効率で製造する方法を提供するものである。又、本発明は、この製造方法に用いられる組換え体DNA及び大腸菌、並びに該組換え体DNAの製造方法を提供するものである。さらに本発明は、バクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNAとハイブリダイズ(交叉)するDNA断片を提供するものである。

[課題を解決する手段]

すなわち、本発明の1つの態様はバクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNA中に存在する、プロリンのカルボキシル側のペプチド結合を加水分解するプロテアーゼ、すなわち、ポストプロリルペプチダーゼをコードする構造遺伝子を、大腸菌をコードする構造遺伝子を組み込んだ、大腸菌内で複製可能なものである。組み込むべきポストプロリルペプチダーゼをコードする構造遺伝子は、細菌の分類学上バクテロイデス・ジンジバリスと同定される菌株であれば、いずれの菌株由来のものであってもよい。好ましい菌株例としては、バクテロイデス・ジンジバリスATCC 33277株又はバクテロイデス・ジンジバリス381株(米国フォーサイス・デンタル・センター由来)を挙げることができる。

大腸菌用ベクターとしては、大腸菌内で複製することができるものであって、適当なマーカーを有するものが用いられる。このような大腸菌用ベクターは種々のものが知られており、市販されている。本発明ではこのような公知のベクターのいずれをも用いることができる。適当な例として、pBR328、pHC79等を挙げることができる。

本発明の組換え体DNAは次の5つの工程からなる方法によって製造することができる。

第1工程

第1工程では原料となる染色体DNAを細胞から抽出し、これを断片化する。原料となる染色体DNAはバクテロイデス・ジンジバリス株の細胞より抽出されたものであり、ポストプロリルペプチダーゼをコードする遺伝子を含むものである。

染色体DNAを細胞から抽出する操作は公知のフェノール法[ケイ・ミウラ、バイオヒミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ(K. Miura, Biochim. Biophys. Acta)72, pp619-629(1963)]によって行なうことができる。

抽出したDNAを断片化する操作は制限酵素又は塩基配列特異性のない、エンドヌクレアーゼによって行なうことができる。さらにまた、機械的処理によって染色体DNAを断片化することも可能である。

第2工程

第2工程では、第1工程で得られた染色体DNA断片を大腸菌用DNAベクターに組み込んで組換え体DNAを作製する。第1工程において、接

ができる。

又、第1工程で得られた染色体DNA断片が3、0～40Kb程度の大きなDNA断片の場合は、ラムダインビトロパッケージング法により、組換えDNAをラムダファージの頭部内に取り込ませ、このファージ粒子を大腸菌に感染させることによって、組換え体DNAを大腸菌の細胞内に導入することもできる。この場合、大腸菌用ベクターとしては、ラムダファージDNA由来のコス部位をベクターDNA中にもった、いわゆるコスミドベクターが用いられる。例えば、pHC79を挙げることができる。

第4工程

第4工程では、形質転換された細菌のうち、原料染色体DNA中のポストプロリルペプチダーゼ遺伝子を含むDNA断片を有する組換え体DNAで形質転換され、それにより、少量のバクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼを産生する菌を選択する。

先ず、用いたDNA導入ベクターのマーカーに

刃末端を生じる制限酵素を用いた場合には、同じ制限酵素で前記したDNA導入ベクターを切断し、第1工程で得られた染色体DNA断片とアニーリングした後、T4DNAリガーゼのようなDNAリガーゼでこれらを連結することによって組換え体DNAを作製することができる。この場合、組換えの効率を高める為に、DNA導入ベクターを制限酵素で切断した後、公知のウルリッヒ(Ullrich)らの方法によるアルカリホスファターゼ処理をこれに施すことが望ましい。

又、第1工程において、平滑末端を生じる制限酵素又は塩基配列特異性のないエンドヌクレアーゼを用いた場合、及び機械的処理によって染色体DNAを断片化した場合には、末端に適当な制限酵素で切断されるリンカーを結合させ、ベクターDNA断片と連結させることもできる。

第3工程

第3工程では、第2工程で得られた組換え体DNAで大腸菌を形質転換する。一般に、形質転換は公知のコンピテントセル法によって行なうこと

によって、組換え体DNAを含有する菌を一次選択する。ベクターとしてpBR322、pHC79を用いた場合には、菌をテトラサイクリン或はアンピシリン含有培地中で培養し、テトラサイクリン耐性菌或はアンピシリン耐性菌を得る。

次に、このようにして得られた抗生物質耐性菌を同じく該抗生物質を含む培地上に接種し、これをマスタープレートとする。マスタープレート上で生育した組換え体大腸菌クローンについては、そのコロニーの一部づつを順番に釣菌してゆき、それぞれのクローンをリゾチームを含有するバッファー液中に懸濁し、さらに凍結融解法にて溶菌させる。又、菌を溶菌させる他の方法としては超音波処理等機械的破壊方法も可能である。

このようにして得られた大腸菌溶菌液中のポストプロリルペプチダーゼ活性を測定することで目的とする原料染色体DNA中のポストプロリルペプチダーゼ遺伝子を含むDNA断片を有する組換え体DNA保持菌を二次選択することができる。ポストプロリルペプチダーゼ活性を測定する方法

としては、公知の合成基質を使った測定方法が用いられ、その際、使用される基質はプロリンのカルボキシル側に発色基、たとえばβ-ナフチルアミンやp-ニトロアニリン等がアミド結合しているものであればいずれでも良い。例えば、グリシループロリン-イ-メトオキシ-β-ナフチルアミド・塩酸塩やNα-ベンゾイル-アルギニルーグリシルーフェニルアラニループロリン-イ-メトオキシ-β-ナフチルアミドが挙げられる。反応液中の基質濃度は通常0.05ないし2mMで、好ましくは0.2mM程度である。

第5工程

第5工程では、第4工程で二次選択した細菌から、組換え体DNAを回収する。この回収は前記したフェノール法及び密度勾配遠心法により容易に行なうことができる。

サブクローニング

第5工程によって得られた組換え体DNAをさらにサブクローニングすることによって不要なDNA部分を切り落とし、組換え体DNAを安定に

制限酵素切断部位を持つ。すなわち、サブクローニングによって得られた組換え体DNA上に存在するバクテロイデス・ジンジバリスのDNA断片は約3.5Kbの大きさであり、BamHI切断部位からSau3A-I切断部位までを含んでいる。又、その制限酵素切断部位は、BamHI部位より約30bp離れたところにHincII部位、約150bp及び約3050bp離れたところにEcoRV部位、約900bp離れたところにPvuII部位、約1650bp離れたところにAatI部位、約1800bp離れたところにPvuI部位、約2160bp離れたところにBglI部位、約2850bp離れたところにHindIII部位及びHindIII部位の近傍にKpnI部位が存在する。

この菌株を培養し、菌体内から酵素を回収することによってポストプロリルペプチダーゼを製造することができる。大腸菌の培養は公知の方法によって行なうことができる。例えば、適当な炭素源、窒素源及び微量の金属元素を含む培地中で振盪培養することによって行なうことができる。炭

細胞内で保持させ、且つ、酵素産生量をさらに高めることができる。サブクローニングは得られた組換え体DNAを適当な制限酵素で切断し、これを前記と同様に大腸菌用ベクターに組み込み、形質転換し、菌を選択し、組換え体DNAを回収することによって行なうことができる。サブクローニングにおける出発材料となる組換え体DNAを切断する制限酵素は、酵素の構造遺伝子部分中に切断箇所を有するものでなければいずれの制限酵素をも用いることができる。サブクローニングは複数回行なうことができ、1回のサブクローニング毎に小さく切断してゆくことができる。

前記の第5工程、又はその後のサブクローニングによって得られた組換え体DNAで大腸菌を形質転換することにより、バクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼを産生する細菌を得ることができる。又、サブクローニングによって得られた組換え体DNA上に存在するバクテロイデス・ジンジバリスのDNA断片は、第1図の代表的な制限酵素地図に示すとおり

の制限酵素切断部位を持つ。すなわち、サブクローニングによって得られた組換え体DNA上に存在するバクテロイデス・ジンジバリスのDNA断片は約3.5Kbの大きさであり、BamHI切断部位からSau3A-I切断部位までを含んでいる。又、その制限酵素切断部位は、BamHI部位より約30bp離れたところにHincII部位、約150bp及び約3050bp離れたところにEcoRV部位、約900bp離れたところにPvuII部位、約1650bp離れたところにAatI部位、約1800bp離れたところにPvuI部位、約2160bp離れたところにBglI部位、約2850bp離れたところにHindIII部位及びHindIII部位の近傍にKpnI部位が存在する。

素源としては、グルコース又はグリセリン等を用いることができる。炭素源の濃度は通常0.1ないし10重量%、好ましくは2重量%程度である。窒素源としてはペプトン、ポリペプトン、肉エキス等の有機態窒素の他、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等の無機態窒素も用いることができる。窒素源の濃度は0.5ないし5重量%、好ましくは2重量%程度である。又、組換え体DNAの脱落を防止する為に、用いたプラスミドベクターの薬剤耐性マーカーに対応する抗生物質を培地に加えてもよい。用いたベクターがpHC79である場合には、培地にアンピシリンを好ましくは50μg/ml程度又はテトラサイクリンを好ましくは10μg/ml程度添加することができる。又、用いたベクターがpBR328である場合には、上記した抗生物質の他に、クロラムフェニコールを好ましくは10μg/ml程度添加することができる。

前記のような培地にて、組換え体DNAで形質転換された大腸菌を培養することによって、細胞

内にバクテロイデス・ジンジバリス由来のポストプロリルペプチダーゼを添加させることができる。得られた培養液を低速遠心分離(5000r.p.m.、20分間)して、菌体を集め、菌体を緩衝液に懸濁後、菌体を破砕又は溶菌させることにより得られる菌体内抽出液から該ポストプロリルペプチダーゼを得ることができる。菌体破砕又は溶菌に際しては公知の方法を用いることができる。例えば、超音波破砕や、リゾチームによる溶菌、凍結融解法等が挙げられる。

[実施例]

以下に本発明の実施例を記載する。実施例において使用した制限酵素は全て東洋紡績株式会社によって市販されているものである。

実施例1

pSN1組換え体DNA及びこれを保持する大腸菌株の調製

バクテロイデス・ジンジバリス381株をアネロビックBHI培地1ℓ(ペプトン2重量%、酵母エキス1重量%、ヘミン0.0005重量%、シ

ち、ラムダファージ粒子の頭部への組換え体DNA導入を行なった。なお、ラムダインビトロパッケージングに際しては市販のパッケージングキット[アメリカン・インターナショナル社

(Amersham International plc.)]を用い、キットに記載の方法に従い作成した。

このようにして得た、頭部に組換え体DNAを取り込んだラムダファージ粒子を常法に従い大腸菌HB101株に感染させることにより、組換え体DNAを大腸菌細胞内に導入した。

組換え体DNA保有菌を一次選択するため、50μg/μℓ濃度のアンピシリンを含む培地(寒天1.5重量%、ペプトン1重量%、酵母エキス0.5重量%、食塩1重量%、残余精製水)で30℃、36時間培養した。生育した組換え体DNA保有菌のコロニーを上記と同じ組成の培地に1個ずつ接種し、マスタープレートを作成した。マスタープレート上の組換え体DNA保有菌のコロニーの一部をそれぞれ約菌し、100μg/μℓ濃度のリゾチームを含む0.1Mトリス-塩酸バッファー

ステイン0.05重量%、微量のビタミンK及び無機塩、精製水残余、pH7.0)中で37℃嫌気条件下で生育させたのち集菌し、生理食塩水(0.85重量%)で1回洗浄した。このようにして得られた菌体からフェノール法によって染色体DNAを抽出し、さらに塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて精製し、500μgの染色体DNAを得た。このDNA500μgをSau3A1にて37℃15分間処理した後、処理液を10~40%ショ糖密度勾配遠心(24,000r.p.m.、40時間)に供した後、約40Kb程度のDNA断片を含む画分を回収した。10μgのコスミドベクターpHC79をBamHIで37℃3時間処理した後、常法に従いアルカリフォスファターゼ処理した。このベクターDNA断片10μgと上記約40Kbの染色体DNA断片10μgを混合し、T4リガーゼで10℃16時間処理して組換え体DNAを調製した。

得られた組換え体DNA1μgを用いて常法に従い、ラムダインビトロパッケージング、すなわ

(0.1μℓ、pH7.0)に懸濁し、常法に従い凍結融解を行ない細胞を溶菌させた。

得られた各溶菌液80μℓと、1mMグリシルーブリン-4-メトオキシ-β-ナフチルアミド・塩酸塩溶液20μℓを、96穴マイクロタイタープレート中に混合し、37℃4時間反応させた後、70μℓの停止、発色液(ファーストガーネットGBC試薬0.5重量%、ツィーン2020重量%、0.1M酢酸-水酸化ナトリウムpH7.0)を加え、顕著な酵素活性を示す株(反応液が赤色を呈する株)を選択し、1株得られた。この菌株を大腸菌HB101/pSN1と命名し、昭和63年5月28日に工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に寄託した(微工研菌寄第10043号)。なお、この菌の菌学的性質はポストプロリルペプチダーゼ活性が極めて高いことを除き、公知の大腸菌HB101株の菌学的性質と同じである。

大腸菌HB101/pSN1からフェノール法によりDNAを抽出し、密度勾配遠心で組換え体

DNAを大量に集め、この組換え体DNAをpSN1と命名した。pSN1の大きさは約4.3Kbである。

実施例2

pSN2組換え体DNA及びこれを保持する大腸菌株の調製

10 μ gのpSN1をBamHIで37℃、3時間処理し、このBamHI処理物をアガロースゲル電気泳動に付してDNA断片を分離した。検出されたDNA断片のうち最もサイズの大きい1.7KbのDNAについては常法に従いゲル中より回収し、T4リガーゼを用いて自己連結させた。

得られた組換え体DNAを用いて、コンピテントセル法により大腸菌HB101株を形質転換した。50 μ g/ml濃度のアンピシリンを含むL培地上で生育した組換え体DNAを保持した大腸菌株については、実施例1に記載した方法に従いポストプロリルペプチダーゼ活性を調べた。調べたコロニーすべてに顕著な酵素活性が見られた。この1.7Kbの組換え体DNAを保持した大腸菌を

アルカリフォスファターゼ処理を行なった後、上記のSau3A1処理したDNA断片と混合し、T4リガーゼを用いて組換え体DNAを得た。このようにして得られた組換え体DNAを用いて、コンピテントセル法により大腸菌HB101株を形質転換し、50 μ g/ml濃度のアンピシリン及び10 μ g/ml濃度のクロラムフェニコールを含む培地上にて形質転換体を生育させた。生育した形質転換体については、実施例1の方法に従いポストプロリルペプチダーゼ活性を調べ、顕著な酵素活性を有する菌を選択した。この菌株を大腸菌HB101/pSN3と命名し、昭和63年5月28日微工研に寄託した(微工研菌寄第10045号)。なおこの菌の菌学的性質はポストプロリルペプチダーゼ活性が極めて高いことを除き、公知の大腸菌HB101株の菌学的性質と同じであった。

大腸菌HB101/pSN2からフェノール法によりDNAを抽出し、密度勾配遠心で組換え体DNAを大量に集めた。この組換え体DNAをpSN3と命名した。第1図に組換え体DNA

HB101/pSN2と命名し、昭和63年5月28日に微工研に寄託した(微工研菌寄第10044号)。

なお、この菌の菌学的性質は、ポストプロリルペプチダーゼ活性が極めて高いことを除き、公知の大腸菌HB101株の菌学的性質と同じであった。

大腸菌HB101/pSN2からフェノール法によりDNAを抽出し、密度勾配遠心で組換え体DNAを大量に集めた。この組換え体DNAをpSN2と命名した。

実施例3

pSN3組換え体DNA及びこれを保持する大腸菌株の調製

50 μ gのpSN2をSau3A1で37℃80分間処理した後、処理液を10～40%ショ糖密度勾配遠心(24,000r.p.m.、40時間)に供した後、3～5Kb程度のDNA断片を含む画分を回収した。又、10 μ gのpBR328をBamHIで37℃、3時間処理した。その後、常法に従って

pSN4の制限酵素地図を示した。図中、白い部分がバクテロイデス・ジンジバリス381株の染色体断片であり、黒い部分がベクターpBR328である。pSN3の大きさは8.4Kbであり、pBR328のBamHI切断部位に3.5Kbのバクテロイデス・ジンジバリス381株由来のDNA断片が組み込まれている。

実施例4

pSN11組換え体DNA及びこれを保持する大腸菌株の調製

10 μ gのpSN3をEcoRVで37℃3時間処理した後、アガロースゲル電気泳動によって、DNA断片を分離した。検出された2本のDNA断片のうち、2.9Kbの小断片を常法に従いゲル中より回収した。このようにして得られたDNA断片を、EcoRV処理及びアルカリフォスファターゼ処理したpBR328とT4リガーゼを用いて連結し、組換え体DNAを作製した。この組換え体DNAを用いて、コンピテントセル法により、大腸菌HB101株を形質転換した。前記と同じ

培地上にて形質転換体を生育させた。生育した形質転換体については、実施例1の方法に従ってポストプロリルペプチダーゼ活性を調べ、顕著な酵素活性を有する菌を選択した。この菌株を大腸菌HB101/pSN11と命名し、昭和63年5月28日微工研に寄託した(微工研菌寄第10046号)。

なお、この菌の菌学的性質は、ポストプロリルペプチダーゼ活性が極めて高いことを除き、公知の大腸菌HB101株の菌学的性質と同じであった。

大腸菌HB101/pSN11からフェノール法によりDNAを抽出し、密度勾配遠心で粗換え体を回収した。

この操作を制限酵素地図を用いて模式的に示したものが第2図である。図中、白い部分がバクテロイデス・ジンジバリス381株の染色体断片であり、黒い部分がベクターpBR328である。pSN11の大きさは7.8Kbであり、pBR328のEcoRV切断部位に2.9Kbのバクテロイデーメトオキシ-β-ナフチルアミド・塩酸塩を用いた。

反応条件は菌体内酵素抽出液320μlに1mM基質を80μl加え、37℃2時間反応後、停止・発色液(ファーストガーネットGBC試薬0.5重量%、ツィーン20 20重量%、0.1M酢酸-水酸化ナトリウムpH7.0)を160μl加え酵素反応によって遊離してくる4-メトオキシ-β-ナフチルアミンの量を分光光度計(O.D.₅₅₅)にて測定した。

結果を第1表に示す。なお表中、37℃で1時間1μMの4-メトオキシ-β-ナフチルアミンを遊離せしめる酵素量を1ユニット(U)とした。

第1表

菌 株	ポストプロリルペプチダーゼ活性(U/μg)
イー・コリHB101/pBR328	0.65
イー・コリHB101/pSN3	20.69
イー・コリHB101/pSN11	33.88

ス・ジンジバリス381株由来のDNA断片が組み込まれている。

実施例5

ポストプロリルペプチダーゼの生産

このようにして得られた大腸菌HB101/pSN3及びHB101/pSN11のポストプロリルペプチダーゼの生産力を調べた。

各菌株を1ℓのシブロス(ペプトン1重量%、酵母エキス0.5重量%、食塩1重量%、精製水残余)に接種し、37℃で振盪培養を行ない、菌体を集菌した。菌体を0.01Mトリス-塩酸バッファ(pH7.5)に懸濁後、超音波処理(100W、2分間)を行ない、遠心分離(12,000r.p.m., 20分間)にて菌体破砕物を除去し、得られた上澄液についてポストプロリルペプチダーゼ活性を調べた。

また、対照として同条件で大腸菌HB101/pBR328株を培養し、前記と同じ操作を行なって得られた上澄液について酵素活性を調べた。

酵素反応の基質には、グリシル-プロリン-4

[発明の効果]

本発明によれば、バクテロイデス・ジンジバリスが菌体外に分泌するポストプロリルペプチダーゼを高効率で製造することができる。又、バクテロイデス・ジンジバリスの染色体DNA中の約3.5KbのSau3A1切断断片中に存在し、EcoRVによって切り出される約2.9Kbのポストプロリルペプチダーゼをコードする構造遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

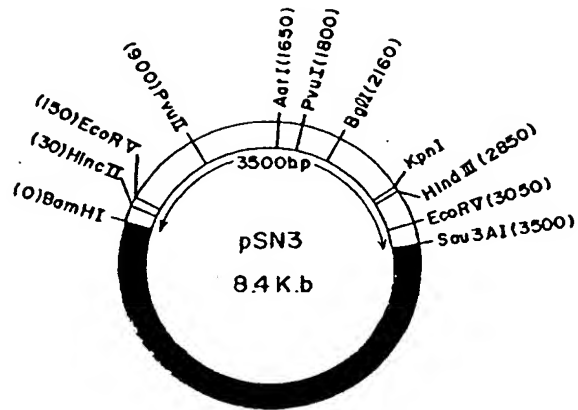
4.図面の簡単な説明

第1図はpSN3の制限酵素切断地図、第2図はpSN11の調製法を模式的に示すpSN11の制限酵素切断地図。

特許出願人 サン ス タ ー 株 式 会 社

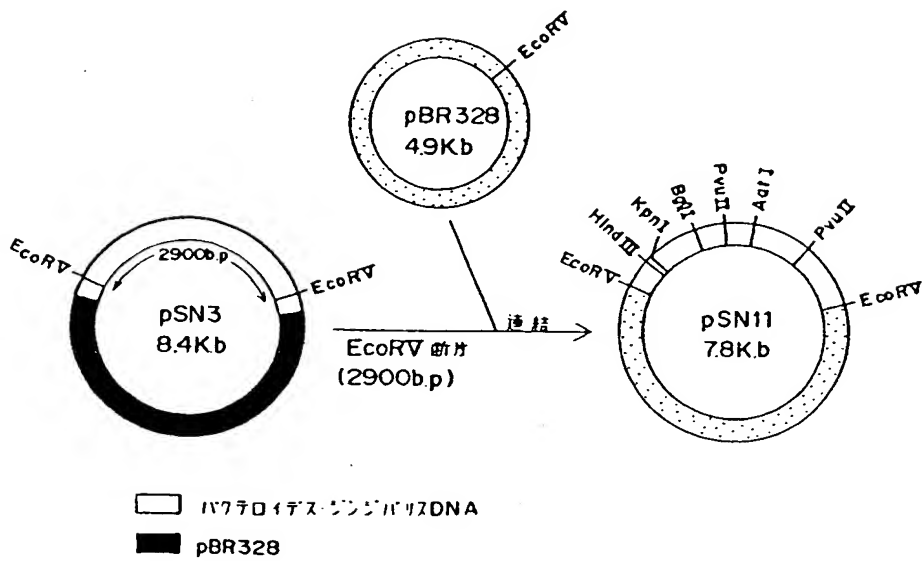
代 理 人 弁 理 士 青 山 俊 ほか1名

第 1 図



□ パリテロイマス・ジニジバリスDNA
 ■ pBR328

第 2 図



□ パリテロイマス・ジニジバリスDNA
 ■ pBR328